

# 纳米银 / 羟基磷灰石涂层的制备与表征

张 敏 史建陆 林昌健

【摘 要】目的:在纯钛表面构筑羟基磷灰石 / 纳米银涂层并进行各种性能表征。方法:采用恒电位电化学法在纯钛表面构建纳米银 / 羟基磷灰石 (Nano-Ag / HAp) 涂层。采用扫描电子显微镜 (SEM), X 射线衍射仪 (XRD)、等检测手段对涂层进行理化性能的表征。考察了涂层的结构组分和表面的微观形貌,而后将 L-929 细胞培养于涂层表面,采用细胞毒性评价,分析比较涂层表面对 L-929 细胞黏附率及增殖率的影响。结果:涂层纳米银粒子直径在 200~400nm 时体外细胞培养显示其具有良好的生物活性。结论:本实验构筑的涂层具有良好的性能和应用前景。

【关键词】 电化学沉积;涂层;生物相容性

中图分类号: R783.1

文章标识码: A

文章编号: 1007-3957(2010)15-14-4

## The preparation and characterization of nano-Ag/HAp bioceramic coating on titanium surface

ZHANG Min, SHI Jianlu, LIN Changjian

Dept. of Orthodontics, Hospital of Taizhou, Zhejiang, Linhai 317000, China

### Abstract

**Objective:** This research was aimed at the electrochemical deposition employed to deposit a Nano-Ag/HAp composite coating on titanium surface. **Methods:** A Nano-Ag/HAp composite coating was deposited on the surface of pure titanium by electrochemical deposition. Scanning electromicroscope (SEM) and X-ray diffraction (XRD) were employed to characterize the obtained coating. In vitro cellular responses of the L-929 to the coating were also evaluated by MTT assay. Conventional Hap coatings and commercially pure titanium were taken as control. **Results:** The Nano-Ag/HAp bioceramic coating has good crystallization and homogeneous on nano-Scale surface morphology. The L-929 culture exhibits satisfactory bioactivity. **Conclusion:** The Nano-Ag/HAp bioceramic coating on titanium surface has promising prospects in the future clinical application.

**key words:** electrochemical deposition; coating; bioactivity

目前多数牙种植体采用纯钛或钛合金,而钛是生物惰性材料,对其表面进行生物学改性处理以提高其生物活性已成为国内外的研究重点<sup>[1]</sup>。电化学沉积法因其反应条件温和、可获得高生物活性的纯羟基磷灰石晶体、无需预先制备羟基磷灰石粉体,操作简单、可控性强、成本低廉等优点而引起研究者的极大兴趣<sup>[2, 3]</sup>。电化学沉积钙磷盐的基本过程是:通过控制电化学反应,调节阴极/溶液界面化学环境,使电解液中的钙磷物种在阴极表面相对高的 pH 环境下达到一定过饱和,进而从溶液相中结晶析出,并沉积在金属电极表面<sup>[4]</sup>。电解

液组成、基底材料、沉积模式、沉积温度、电极表面状况等对电化学沉积产物的物性均有影响。电化学沉积法得到的钙磷沉积层往往要通过后处理使之转化为纯羟基磷灰石。1991 年加拿大学者 Shir Khanzadeh<sup>[5]</sup>找到一种直接从溶液中直接沉积出纳米相纯羟基磷灰石的条件,并分析了其形成的机理。本研究根据牙种植体的临床应用要求,采用电化学的方法在医用金属钛表面构筑具有特殊结构的 Nano-Ag/HAp 涂层。旨在用简便、廉价的方法

作者单位: 317000 浙江省台州医院口腔科 (张敏); 361003 厦门市口腔医院 (史建陆); 361005 厦门大学化学院固体表面物理化学国家重点实验室 (林昌健)。

制备理想的生物材料，使材料能兼备羟基磷灰石的生物活性、金属钛的机械性能以及银的高效抗菌性。发展一种新的复合电沉积模式，即以理想的银离子配位剂，配成含水  $\text{CaCl}_2$ ， $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ， $\text{AgNO}_3$  和  $\text{KI}$  的沉积液。此沉积模式与传统模式不同，不需预先制备羟基磷灰石粉末再加入到银的镀液中。该法是以四组分溶液为沉积液，在阴极电位下银的还原沉积和钙磷盐的电解沉积同时发生，得到纳米银/二水合磷酸氢钙 (DCPD) 复合涂层，并通过简单的后续处理得到 Nano-Ag/HAp 复合涂层。应用 XRD、SEM 表征材料的组分、结构等理化性质。

1 材料和方法

1.1 实验材料的预备及制备

将商业纯钛（厦门大学化学化工学院提供）切割成 10mm×10mm×1mm 的钛板，分为 3 组，经 600、800、1000、1200、1500# 砂纸逐级打磨后，然后在丙酮、乙醇和三次蒸馏水依次超声清洗各 15min。在 1:1 浓硫酸和浓盐酸混合液中浸泡一小时，以除去钛板表面的氧化钛，并形成氯化膜保护其不被氧化。以沉积银颗粒的钛板为工作电极阴极，1cm×1cm 铂片为对电极，饱和甘汞电极做参比电极。电解液组分为无水  $\text{CaCl}_2$ ， $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ， $\text{AgNO}_3$  和  $\text{KI}$ ，控制电位为-1.30V，室温下沉积 10min。复合电沉积后得到的材料是纳米银/二水合磷酸氢钙 (DCPD) 复合涂层。经 75℃ 2.5mol/LNaOH 中水浴 3 小时，使纳米银/二水合磷酸氢钙 (DCPD) 转化为 Nano-Ag/HAp 复合涂层。

1.2 扫描电镜 (SEM)

采用 LEO-1530 场发射扫描电镜（德国 LEO 公司）和 XL-30ESEM-TMP 环境扫描电镜（荷兰 Philips-FEI 公司）加速电压均为 20kV，观察涂层表面形貌。

1.3 X 射线衍射 (XRD)

用 Panalytical X'pert PRO X 射线衍射仪（Panalytical 公司）型号 X'pert PRO 作材料 XRD 表征。Cu Kα 靶，λ0.1540nm，工作电流 30mA，工作电压 40kV。

1.4 实验细胞株、试剂及设备

L-929（厦大学生命科学院提供）。实验用细胞为传代 48h 生长旺盛的细胞。含有 10% 的小牛血清的 DMEM 培养液（Gibco,美国），0.25%胰蛋白酶（Gibco,美国），PBS（磷酸盐）缓冲液；噻唑蓝（Serva,美国），二甲基亚砜（上海金山化工厂）；96 孔板（Coster，美国）；酶联免疫检测仪（Bp800，Biohit,美国）；超净工作台（YJ-875DA 型，苏净集团安泰公司制造）；细胞培养箱（BB5060 型，日本）；倒置显微镜（TE300，Nikon,日本）等。

1.5 实验方法

材料浸提液的制备，依据 GB/T 16886.12-2000 (ISO 10993-12:1996)" 医疗器械生物学评价第 12 部分：样品制备与参照样品" 进行。将浓度为  $5\times10^3$  个/ml 的 L-929 细胞悬液以 100μl/孔接种于 96 孔板中，每组 6 孔，置于恒温培养箱中培养 24h，待贴壁后分别加入 100μl 浸提液；空白组加入 100μl 新鲜培养液，阳性对照组加入 100μl 苯酚。然后放入上述环境中培养 48h。每孔加入 5g/L 噻唑蓝 20μl，继续培养 4h。然后吸弃原液，加入二甲基亚砜 200μl，震荡 10min，使用酶联免疫检测仪在波长 490nm 处测定吸光度值。

1.6 细胞毒性评价

计算细胞的相对增殖度（relative growth rate, RGR）。RGR (%) = 试样组吸光度值/空白对照组吸光度值×100%。采用 SPSS11.0 统计软件包对数据进行处理，采用单因素方差分析（one-way ANOVA）比较各实验材料 MTT 值之间的差异是否有统计学意义。

2 结 果

2.1 涂层的表面检测结果

2.1.1 扫描电镜 (SEM) 表征

图 1 是本实验中得到的羟基磷灰石/纳米银涂层的 SEM 图片。由图可见，Nano-Ag/HAp 涂层整体形貌比较均匀致密，结构相对有序。Nano-Ag/HAp 涂层的表面形貌，羟基磷灰石呈多孔状，孔径为微纳米级，200-400nm 的 Ag 颗粒，均匀分散于多孔蜂窝状的羟基磷灰石中。这些纳米级晶体可以增加材料的生物活性。而表面的微孔则有利于营养物质的吸附和交换，促进细胞的早期黏附。图 2 是纳米银羟基磷灰石复合涂层的剖面图形，据图可见纳米银羟基磷灰石涂层与钛基底结合紧密，涂层厚薄均匀，厚约 180μm。

2.1.2 XRD 的表征

图 3 为纳米银羟基磷灰石涂层的 XRD 谱图。从衍射谱图中可以看到有羟基磷灰石晶体的特征峰。但是并没有银颗粒的标准特征峰，说明银颗粒

表 1 Nano-Ag/HAp 的体外细胞毒性测定结果 (x̄±s,n=6)

实验材料	吸光度值	RGR (%)	毒性分级
HAp 组( )	0.748±0.015	86.66±2.23	1
Nano-Ag/HAp 组( )	0.829±0.042	95.98±5.59	0~1
阳性对照组( )	0.023±0.006	8.88±2.26	4
空白对照组( )	0.858±0.008	100.0	0

注:阳性对照组为苯酚；空白对照组无材料；RGR：细胞相对增殖度

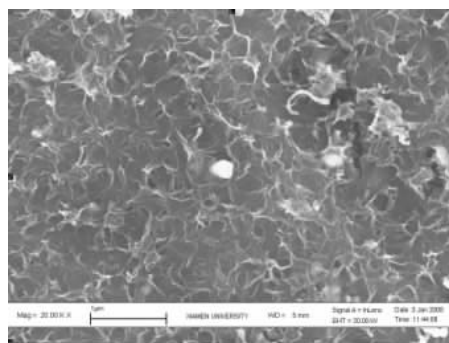


图1 电沉积 Nano-Ag/HAp 的 SEM 照片 (×20000)

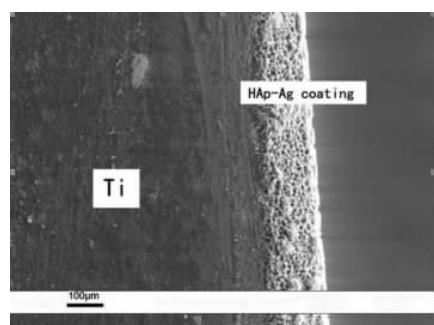


图2 电沉积 Nano-Ag/HAp 的侧面 SEM 照片 (×20000)

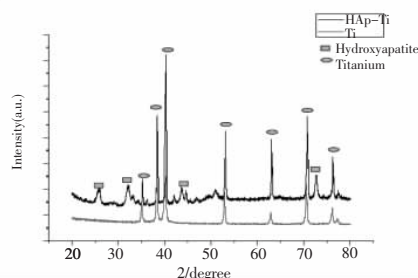


图3 电沉积 Nano-Ag/HAp 与纯钛拟和的 XRD

为纳米亚晶状。

### 2.1.3 细胞毒性评价

表1显示了对 Nano-Ag/HAp 涂层采用 MTT 比色法测定的吸光度值、细胞相对增殖率及毒性分析结果。表2结果显示, Nano-Ag/HAp 涂层对 L-929 无毒性。

## 3 讨论

纳米技术是一门在 0.1~100nm 空间尺寸内操纵原子和分子、使其按照一定的方式排布从而制造具有特定功能新物质的技术, 与信息技术和生物技术并列为未来经济的三大支柱。被国际上公认为 21 世纪最具前途的科研领域。纳米技术在生

物医药领域的研究和应用, 极大地推动了相关学科的交叉和融合, 并诞生出一批新兴的交叉学科, 如纳米医学、纳米生物学和纳米口腔医学。纳米级银是以纳米技术为基础研制而成的新型抗菌材料, 降低银颗粒的尺寸使其达到纳米级, 可发挥其表面效应, 大大提高其抗菌活性。纳米银粉可装载于活性炭纤维、纺织品、涂料等产品中, 制备出具有抗菌功能的产品。将纳米银渗透到织物中, 可制备多种抗菌纺织品。含纳米银的抗菌纱布可用于治疗烧伤、烫伤。用于治疗烧伤时在 30min 内可分裂引起烧伤感染的各类细菌, 其抗菌效果可持续 3 天。其控制烧伤感染的功能比现在临床使用的磺胺嘧啶银、诺氟沙星银要好得多。关于纳米银杀菌作用的原理, 多数学者认为超细状态银由于其比表面积极大, 遇水或在水溶液中释放出银离子:  $\text{Ag} \rightarrow \text{Ag}^+ + \text{e}^-$ , 所以纳米银的杀菌作用主要与银离子有关<sup>[6]</sup>。Pavel<sup>[7]</sup>等人认为, 纳米银的作用方式与  $\text{Ag}^+$  相似, 只不过他们的有效浓度不同, 纳米银是在纳摩尔水平, 而  $\text{Ag}^+$  是在微摩尔水平。通常纳米银颗粒直径极微小, 他所具有的独特的小尺寸效应和表面效应, 可以轻易地进入病原体, 与菌体中酶蛋白的巯基-SH 迅速结合, 使一些以此为必要基团的酶失去活性, 从而达到杀灭细菌、修复组织、促进伤口愈合的作用。有报道认为纳米银中的银离子同时还可以与细菌中的-NH、-COOH 等反应。另外, 当银离子的价态不同时, 其杀灭或抑制病原体的能力也将有很大的差别, 这可能与其氧化性的阳电荷电位有关。高氧化态银离子的还原电势较高, 银离子的阳电荷吸住载有阴电荷细菌的能力强、速度快。此时银离子能迅速渗透并与菌体中的蛋白质结合形成蛋白银 (或成为变性蛋白), 细菌则因正常组织被破坏而死亡。使纳米银通过缓释作用释放  $\text{Ag}^+$  因而具有传统无机抗菌剂所无法比拟的优良抗菌效果和安全性, 是一种具有长效性和耐热性的抗菌剂。而纳米级载银无机抗菌剂就是把具有抗菌作用的银离子通过溶胶-凝胶、离子交换等技术依附在纳米级的载体上, 如  $\text{SiO}_2$ 、 $\text{TiO}_2$ 、磷酸复盐等。由于超细纳米级粉体颗粒的特殊效应, 大大提高了整体的抗菌效果, 使抗菌剂耐温性、粉体细度、分散性和功能效应都得到了充分的发挥。余文培等<sup>[8]</sup>比较了 6 种国内外知名品牌的纳米级载银无机抗菌剂对口腔病原菌的抗菌活性, 结果对变形链球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌等均有良好的杀菌效

(下转第 47 页)



- 19 Ohgushi H, Okumura M, Yoshikawa T, et al. Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res*, 1992, 26:885-895.
- 20 Yuan H, Zou P, Yang Z, et al. Bone morphogenetic protein and ceramic-induced osteogenesis. *J Mater Sci Mater Med*, 1998, 9 (12) :717-721.
- 21 Nevins M, Camelo M, Nevins M L, et al. Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone [J]. *J Periodontol*, 2003, 74 (9) :1282-1292.
- 22 尹飏,张余,等.骨组织工程细胞支架复合珊瑚羟基磷灰石生物相容性研究.中国骨与关节损伤杂志, 2006,21 (11) :900-902.
- 23 孟祥勇,周平秀,吴求亮.一种新型复合人工骨修复家兔下颌骨骨缺损的扫描电镜观察.现代口腔医学杂志,2005,19 (6) :632-634.
- 24 唐尤超,王远勤,汤炜.基因修饰骨髓间充质干细胞复合珊瑚羟基磷灰石支架材料修复骨质疏松性下
- 颌骨缺损.中国组织工程研究与临床康复,2008,12 (14) :2601-2605.
- 25 Weibrich G, Kleis WK, Hitzler WE, et al. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2005, 20 (1) :118-123.
- 26 张洪涛,刘康,等.珊瑚羟基磷灰石材料对富血小板血浆诱导培养人骨髓基质干细胞成骨特性的影响.中国组织工程研究与临床康复,2008,12 (45) :8815-8818.
- 27 Kim SG, Chung CH, Kim YK, et al. Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2002, 17 (1) :86-94.
- 28 张森林,毛天球,等.生物可降解的骨组织工程支架材料的研究进展.医学研究生学报,2008,21 (10) :1098-1100.

(上接第 16 页)

果。将纳米银与生物陶瓷羟基磷灰石联合起来制备复合涂层,具有良好的应用前景。电化学方法制备陶瓷技术在一定程度上克服了以上方法的不足之处。它是一种条件温和,方便易行的方法。电化学合成羟基磷灰石涂层已有广泛而深入的研究。

张富强<sup>[9]</sup>等人通过分析 6 种纳米载银无机抗菌剂不同浓度银离子稀释液对体外细胞的毒性,初步评价它们的生物安全性,结果显示 6 种纳米载银无机抗菌剂高浓度稀释液对 L-929 均有毒性,当浓度 $\leq 25\text{g/l}$ 时已无毒性。本项实验结果显示,当涂层中纳米银颗粒含量为 1.04%时,L-929 细胞的 RGR 为  $95.98 \pm 5.59$  (%),毒性分级为 0~1。充分验证了这种新型材料的细胞毒性完全符合生物材料的要求。该新型材料的细胞生物安全性较好,为临床口腔材料的应用提供新的思路。

## 参考文献

- 1 Jones FH. Teeth and bones: Applications of surface science to dental materials and related biomaterials. *Surf Sci Rep*, 2001, 42 (3) : 75.
- 2 Redepenning J, McIssac JP. Electrocrystallization of brushite coatings on prosthetic alloys. *Chem Mater* 1990, 2:625-627.
- 3 Hu HB, Lin CJ, Hu R, Leng Y. Preparation of hydroxyapatite/poly (vinyl alcohol) composite film with uniformly dispersed hydroxyapatite particles using citric acid. *Mater Sci Engn C*. 2002, 20:209
- 4 Kuo MC, Yen SK. The Crystal growth behavior of hydroxyapatite coating on Titanium substrate under electrochemical deposition conditions. *Mater Sci Engn C*. 2002, 20:153.
- 5 Shirkhanzadeh M. Bioactive calcium phosphate coating prepared by electrodeposition. *Mater Sci Lett*, 1991, 10: 1415-1417.
- 6 Liao SY, Read DC, Pugh WJ, et al. Interaction of silver nitrate with readily identifiable group: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Lett Appl Microbiol*, 1997, 25 :279-283.
- 7 Pavel D, Judith D, Khoosheh KG, et al. Chemiosmotic Mechanism of Antimicrobial Activity of Ag<sup>+</sup> in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46:2668-2670.
- 8 余文培 张富强,傅远飞.6 种纳米载银无机抗菌剂对口外病原菌的抗菌活性比较.上海口腔医学杂志, 2003, 12: 356-358.
- 9 张富强,余文培,傅远飞.6 种纳米载银无机抗菌剂的体外细胞毒性比较.中华口腔医学杂志, 2005, 40:504-507.